

Estabelecimento de uma cultura de tardígrados limno-terrestres em laboratório e desenvolvimento de metodologias alternativas de desidratação de tardígrados

PULSCHEN, André Arashiro^{*}; MENECHIN, Silvana Perissato^{**}

Resumo

Tardígrados (Filo Tardigrada) são animais invertebrados conhecidos como ursos d'água, que existem em quase todas as localidades do planeta, encontrados do Ártico até a Antártida, alto do Himalaia até 6000 m de profundidade oceânica. A presença dos animais em ambientes tão diversos se deve à sua capacidade de entrar em criptobiose, estado induzido por condições adversas, no qual os animais sobrevivem à desidratação, temperaturas de -192 °C até acima de 100 °C, pressão de 7500 Pa, níveis de radiações de 7000 Gy, entre outras condições. Atualmente, o filo tem sido mais investigado, em razão da sua capacidade de tolerar condições extremas, as quais são interessantes do ponto de vista biotecnológico. Também possui importância para estudos de filogenia de metazoários, estudos de evolução e também para a astrobiologia. Não existem relatos de trabalhos de criptobiose e cultivo dos animais no país, sendo o primeiro do gênero. O trabalho buscou estabelecer uma cultura de tardígrados limno-terrestres em laboratório, isolados da natureza e também encontrar metodologias alternativas ao uso de dessecadores químicos para a desidratação e testes de anidrobiose. Estabeleceu-se com sucesso um cultivo do tardígrado *Macrobotus hufelandi*, utilizando-se a microalga *Chlorella vulgaris* como alimento, em pequenos recipientes plásticos de aproximadamente 30 mm de diâmetro e 20 mm de altura, realizando-se a troca do alimento e da água a cada dois dias. As metodologias de desidratação propostas alcançaram índices de sobrevivência de 70 e 77,73%, similares aos relatados na literatura, podendo constituir alternativas mais simples para estudos com anidrobiose.

Palavras-chave: Tardigrada. Cultivo em laboratório. Criptobiose. Desidratação.

^{*} Acadêmico de Biotecnologia pelo Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de São Carlos.

^{**} Pesquisador-Doutor do Departamento de Biotecnologia Vegetal e Produção Animal (DBVPA) – Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal São Carlos; Rodovia Anhanguera, km 174 - SP 330 - CEP 13600-970, Araras, São Paulo, Brasil; andrepulschen@hotmail.com

Establishing a culture of limno-terrestrial tardigrada in laboratory and development of alternative methods of tardigrada dehydration

Abstract

Tardigrades (Phylum Tardigrada) are invertebrate animals also known as water bears, that occurs almost in every locations on Earth, from the Arctic to Antarctic, from Himalayan top to the bottom of the ocean. One of the reasons that the animals can live in such places lays on his cryptobiotical hability, state that it's induced by hard conditions. In such state, they can survive desiccation, temperatures from -192 °C and up to 100 °C, pressure of 7500 Pa, radiation levels of 7000 Gy and another's conditions. Currently, the phylum has been deeply investigated, since the cryptobiotical phenomenon it's extremely interesting from the point of view of Biotechnology. The phylum it's also important to metazoan phylogeny studies, evolutionary studies and to astrobiology. There is no relates from cryptobiotical studies and lab rearing of tardigrades in Brazil, so this is the first work of the genera. The present work had as objectives: establishing a rearing system of a limno-terrestrial Tardigrade and also the development of alternatives methods of dissecation of the animals, alternatively the use of dessicators and chemical solutions. It has been established successfully a culture of the Tardigrada Macrobiotus hufeandi, using the microalgae Chlorella vulgaris as food, in small plastic containers of about 30 mm diameter and 20 mm in height, with water and food being exchanged every two days. The proposed methods of dehydration achieved survivor rates of 70 and 77%, similar results of existing studies in the literature and may be simpler alternatives to anhydrobiosis studies.

Keywords: Tardigrada. Lab rearing. Cryptobioses. Dessication.

1 INTRODUÇÃO

Tardígrados, também conhecidos como ursos d'água, são pequenos metazoários com tamanho variando de 0,1 mm até 1,2 mm, os quais constituem um filo a parte (Filo Tardigrada). Possuem quatro pares de patas com garras, órgãos visuais similares a "olhos" (GREVEN, 2007); sistema muscular complexo (SCHIMIDT-RHAESA; KULESSA, 2007); órgãos osmorregulatórios (HALBERG et al., 2009); um aparelho de alimentação e sistema reprodutivo extremamente desenvolvido (JACOBSEN, 1996; BERTOLANI; REBECCHI; BECCACCIOLI, 1990), demonstrando a complexidade desse animal, apesar de seu tamanho diminuto.

Os tardígrados podem ser divididos em duas classes: Heterotardígrados, os quais apresentam o corpo coberto por uma armadura, e eutardígrados, que não apresentam armadura. São encontrados desde o fundo de oceanos até as mais altas montanhas (NELSON, 2002). Podem habitar desde ambientes marinhos, de água doce, praias, musgos, líquens e em alguns casos até flores. Contudo, por dependerem de um filme de água ao redor para estarem ativos, devem ser considerados animais aquáticos (RAMAZZOTTI; MAUCCI, 1983). Segundo a lista de Degma, Bertolani e Guidetti (2011), com base nos trabalhos de Guidetti e Bertolani (2005) e Degma e Guidetti (2007), já foram descritas mais de mil espécies de tardígrados diferentes. Contudo, a tendência é que cada vez mais espécies sejam descritas e descobertas. Alguns tardígrados apresentam reprodução sexuada, porém muitos

.....
são hermafroditos ou se reproduzem partenogenicamente, mesmo aqueles que podem se reproduzir sexuadamente (BERTOLANI, 2001; MJOLBERG et al., 2011).

Uma das características mais marcantes do filo é sua capacidade de entrar em criptobiose, um estado de “animação suspensa”, frente a condições adversas extremas. Dependendo da condição, o animal pode entrar em diferentes formas de criptobiose: criobiose (induzida pelo frio), anidrobiose (induzida pela desidratação), osmobiose (induzida por diferenças de pressões osmóticas) e anoxibiose (induzida pela ausência de oxigênio (MJOLBERG et al., 2011). O estado de anidrobiose é o mais estudado, e é o que ocorre naturalmente quando líquens e musgos desidratam. Neste estado, os animais se contraem em forma de “tun” (similar a um pequeno barril), podem sobreviver a condições extremamente árduas, como temperaturas de até -192 °C (RAMLOV; WESTH, 1992), temperaturas acima de 100 °C por breves períodos (HENGHERR et al., 2009b), intensas radiações (HOKIRAWA et al., 2006), pressões de até 7,5 GPa (ONO et al., 2008), exposição a álcool (RAMLOV; WESTH, 2001) e sobrevivendo até mesmo ao vácuo espacial e radiação solar, tornando-se um dos poucos seres vivos capazes de tolerar tais condições (JÖNSSON et al., 2008). Mesmo em estado ativo e hidratado, os animais toleram temperaturas de -30 °C (HENGHERR et al., 2009a).

Diversos estudos hoje buscam entender como o animal consegue sobreviver a exposições tão severas e depois voltar à atividade. Proteínas de choque de calor, síntese de açúcares como a trealose e proteínas LEA (“*late embryogenesis abundant*”) têm sido apontadas como principais responsáveis por garantir a sobrevivência dos animais à desidratação e ao congelamento (SCHILL et al., 2009; JÖNSSON; SCHILL, 2007; WRIGHT, 2001).

Entre os diversos estados de criptobiose, o mais estudado é o de anidrobiose (BERTOLANI et al., 2004). Todavia, os animais somente resistirão à desidratação e entrarão em anidrobiose de forma correta se a evaporação da água ao seu redor ocorrer de forma lenta e a umidade do ar estiver elevada, conforme relatado por Crowe (1972), o qual observou que animais desidratados a umidades relativas do ar superiores a 75% garantiam maiores índices de sobrevivência.

Atualmente, os mecanismos celulares e moleculares que permitem aos animais sobreviverem à desidratação e ao congelamento têm despertado muito a atenção do ponto de vista biotecnológico, já que o conhecimento de tais sistemas permitiria a preservação de alimentos, amostras de sangue e vacinas à temperatura ambiente, e até mesmo evitaria que órgãos e tecidos fossem danificados em processos de congelamento, aumentando assim sua vida útil (SCHILL et al., 2009). O Projeto Funktionelle analyse dynamischer Prozesse in Cryptobiotischen Tardigraden (Funcrupta) desenvolvido na Alemanha, tem como objetivos entender os mecanismos celulares de criptobiose dos tardígrados, visando a entender processos de estabilização celular. Tal projeto vem rendendo diversos artigos científicos sobre o assunto desde 2007 (<<http://www.funcrupta.de/www/en/>>).

Não apenas a biotecnologia tem interesse no conhecimento do filo, mas também a astrobiologia. Por meio do Projeto *Tardigrades in Space* (Tardis) enviou-se, em 2007, pela primeira

vez, tardígrados desidratados ao espaço, expondo-os ao vácuo espacial e radiações solares intensas. Quando retornaram a terra, estavam vivos e foram capazes de produzir descendentes férteis (JÖNSSON et al., 2008). Já um trabalho desenvolvido por Hokirawa et al. (2008) propôs o uso do eutardígrado *Ramazzottius varieornatus* como modelo de animal multicelular para estudos astrobiológicos, em razão da sua grande capacidade de tolerância a extremos.

Já em termos de evolução, Gabriel et al. (2007) estudaram o tardígrado *Hyphsibius dujardini*, descobrindo que ele divide muitas características com *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila*, além de proporem o uso dessa espécie de tardígrado como modelo para estudos de biologia do desenvolvimento.

É importante ressaltar que as atividades de taxonomia de tardígrados estão constantemente encontrando novas espécies e corrigindo erros de classificação. Os principais trabalhos taxonômicos existentes se tratam dos realizados por Ramazzotti e Maucci (1983), Guidetti e Bertolani (2005), os quais lançaram um trabalho com chaves de identificação reunindo os animais identificados desde 1983 até 2005 e o trabalho de Pilato e Binda (2010), no qual se encontram chaves de identificação atualizadas para famílias, subfamílias, gêneros e subgêneros de tardígrados.

Quanto à alimentação de tardígrados, é variada e está relacionada principalmente com seu tipo de aparelho bucal e com a disponibilidade de alimentos no local. Normalmente se alimentam de algas e células vegetais, mas podem também se alimentar de rotíferos, nematoides, leveduras, bactérias e em alguns casos até de outros pequenos tardígrados (SCHILL et al., 2011). Grandes tardígrados como *Mienesium tardigradum*, encontrado em diversas regiões do mundo, alimentam-se quase que exclusivamente de rotíferos e nematoides (GLIME, 2010). Considerando que o conhecimento a respeito dos hábitos alimentares dos animais é necessário para o estabelecimento de um sistema de cultivo eficiente, alguns autores realizaram experimentos para a identificação dos diferentes tipos de microalgas e vegetais dos quais tardígrados herbívoros se alimentavam, a exemplo dos trabalhos de Altiero e Rebecchi (2001) e Schill et al. (2011).

Não há relato de estudos de cultivo ou de desidratação dos animais no Brasil. Considerando que o filo possui tanto aplicações em filogenia de metazoas, estudos de evolução, interesse biotecnológico e astrobiológico, o presente trabalho objetivou desenvolver metodologias alternativas de desidratação dos animais, buscando evitar o uso de dessecadores químicos, e o estabelecimento de uma cultura de tardígrados em laboratório. O estabelecimento de uma cultura em laboratório é o primeiro passo para permitir estudos mais profundos de qualquer natureza sobre o animal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DE AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE TARDÍGRADOS DA NATUREZA

Para a obtenção de tardígrados da natureza, amostras de líquen e de musgos foram coletadas de diferentes pontos do *Campus* da Universidade Federal de São Carlos de Araras. A área

encontra-se a uma altitude média de 611 m e coordenadas geográficas de 22°18'00" de latitude Sul e 47°23'03" de longitude Oeste de Greenwich. As amostras de líquens foram retiradas de telhados próximos ao laboratório, e as amostras de musgo colhidas crescendo sob o muro. As amostras foram coletadas e imediatamente levadas ao laboratório, onde foram colocadas invertidas em placas de petri, as quais foram preenchidas com água destilada e mantidas dessa forma por no mínimo 8 horas, conforme descrito nos trabalhos de Hokirawa et al. (2008) e Otessen e Meier (1990). Depois de transcorrido o tempo necessário, as amostras foram retiradas e as placas com a água foram analisadas sob estereomicroscópio (Medilux MDL-D54-Tri), realizando-se a coleta dos animais encontrados com o auxílio de micropipetas.

2.2 SELEÇÃO DE ESPÉCIES COM POTENCIAL PARA O CULTIVO COM *CHLORELLA VULGARIS*

Cinco espécies de animais coletados das amostras de líquen e musgos foram escolhidas para serem alimentadas com a microalga *Chlorella vulgaris*. As espécies foram selecionadas em decorrência da sua maior abundância e distinção morfológica entre si. As algas foram cultivadas em meio de cultura Braun-Grunow (BGN), descrito por Ripka et al. (1979). Para cada espécie, 10 animais foram coletados e colocados em recipientes plásticos (30 mm de diâmetro e 25 mm de altura), totalizando cinco recipientes plásticos. Os animais foram deixados quatro dias sem alimentação nos recipientes, para reduzir a coloração estomacal. Após os quatro dias, 50 ul de *Chlorella vulgaris* decantada foram adicionados aos recipientes, e os animais observados por uma semana. Para avaliar se os tardígrados se alimentavam da microalga, seus estômagos eram observados todos os dias, sobre estereomicroscópio e microscópio ótico (Olympicus ZX80), verificando-se se o trato digestivo destes apresentava coloração esverdeada (SCHILL et al., 2011).

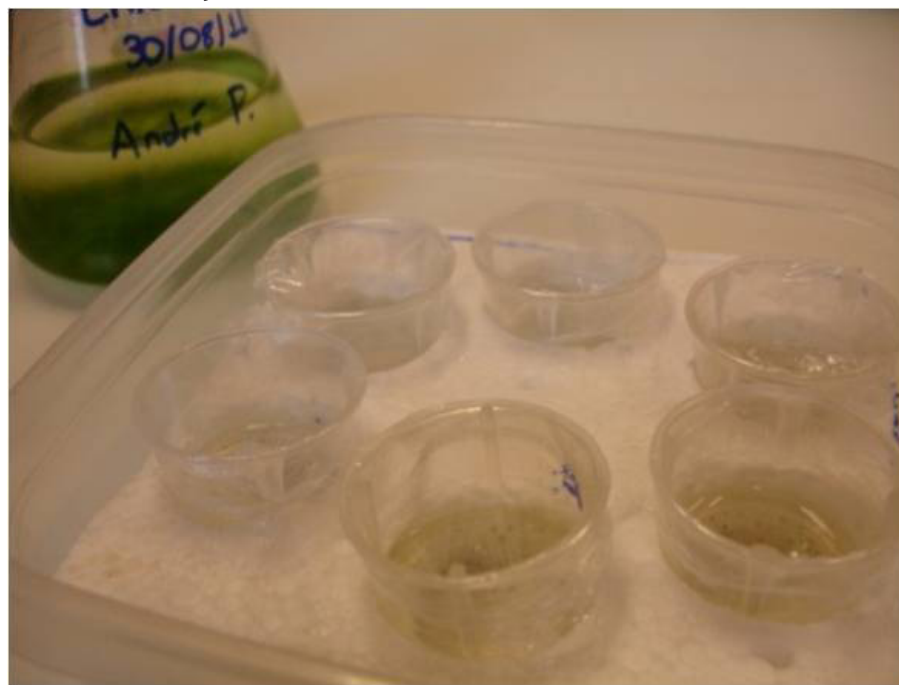
2.3 TAXONOMIA E IDENTIFICAÇÃO

Após a obtenção de uma espécie que se alimentava de *Chlorella vulgaris*, ela foi submetida à análise taxonômica. Animais foram observados sob microscópio óticos, em estado ativo, e também imobilizados, utilizando-se água comercial gaseificada artificialmente (rica em CO₂). Os animais nesse estado ficavam atordoados (anoxibiose), recuperando-se lentamente. Nesse breve período, eram observados e capturados em fotos. Ovos também foram coletados do cultivo e observados para taxonomia completa da espécie. Os animais foram identificados utilizando-se as chaves de identificação de Ramazzotti e Maucci (1983), Guidetti e Bertolani (2005) e de Pilato e Binda (2010). Outra espécie de tardígrado, obtido nas amostras de líquens com características morfológicas bem distintas dos demais tardígrados encontrados também foi submetida à análise taxonômica, seguindo a mesma metodologia descrita.

2.4 ESTABELECIMENTO DE UMA CULTURA DE TARDÍGRADOS EM LABORATÓRIO

O cultivo do tardígrado *Macrobiotus hufelandi*, o qual apresentou afinidade com *Chlorella vulgaris*, foi estabelecido inicialmente com cinco animais da espécie, adicionando-se cerca de 50 µl da microalga decantada em recipientes plásticos de 30 mm de diâmetro e 25 mm de altura, juntamente com cerca de 2 ml de água mineral comercial, a qual era trocada uma vez por semana. Uma solução de Ágar-água (1,5%) foi adicionada ao fundo do recipiente para evitar que os animais escorregassem sobre a superfície plástica e tivessem maior liberdade de locomoção, conforme relatado por Altiero e Rebecchi (2001). Para evitar que as pequenas quantidades de água evaporassem, foi montada uma câmara úmida (Fotografia 1) utilizando-se recipiente plástico com tampa (dimensões: 12 cm x 12 cm x 4 cm de altura) com algodão umedecido no fundo, a qual era tampada e mantida sobre bancada do laboratório em condições ambientes. O cultivo realizado com essa metodologia foi acompanhado com o auxílio de estereomicroscópio.

Fotografia 1: Câmara úmida montada com algodão úmido sob o isopor e os recipientes plásticos utilizados para o cultivo dos animais a temperatura ambiente



Fonte: os autores.

2.5 METODOLOGIAS DE DESIDRATAÇÃO ALTERNATIVAS

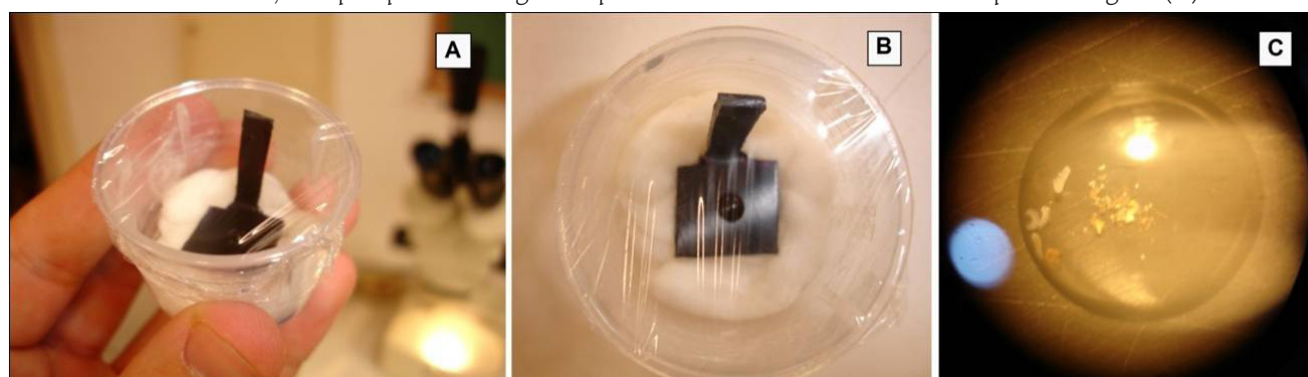
Para os testes de desidratação, foi escolhida e coletada uma espécie de tardígrado presente nas amostras de líquens. Tal espécie foi caracterizada como do gênero *Macrobiotus*, e era

Evidência, Joaçaba v. 10 n. 1-2, p. 69-85, janeiro/dezembro 2010

extremamente abundante e fácil de coletar, sendo escolhida em razão dessas características. Não se conseguiu identificar o animal até o nível de espécie, em decorrência da ausência de ovos para a taxonomia completa.

A primeira metodologia de desidratação constou de algodão umedecido (encharcado com água e espremido para remoção do excesso), colocado no fundo de recipientes plásticos (30 mm de diâmetro e 25 mm de altura). Suportes de plástico foram colocados sobre o algodão e grupos de oito animais sobre o suporte plástico, juntos em uma pequena gota (cerca de 30 ul) com auxílio de micropipeta; por fim, os recipientes plásticos eram tampados com filme plástico e furados uma única vez ao centro, para permitir a evaporação da gota (Fotografia 2).

Fotografia 2 – Unidade experimental, com o suporte plástico e as gotas no centro (A, B). Imagem ampliada da unidade, em que quatro tardígrados podem ser observados no canto esquerdo da gota (C)



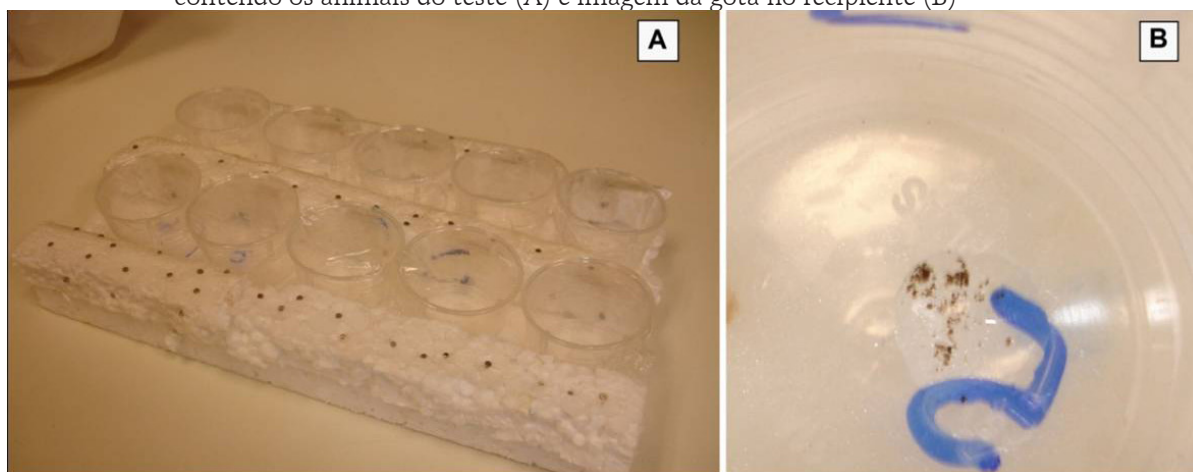
Fonte: os autores.

Foram preparados 10 recipientes com oito animais cada, totalizando 80 animais e 10 repetições. Os recipientes foram deixados sobre uma bancada no laboratório por sete dias, em condições ambientes da sala (temperatura média de 24 °C e umidade relativa média de 50%) Transcorrido o período, os suportes plásticos foram retirados dos recipientes. Sob um estereomicroscópio, gotas de água destilada foram adicionadas sobre os animais desidratados, sendo estes acompanhados em sua recuperação por três horas. Foram considerados sobreviventes animais que apresentavam movimentos coordenados do corpo.

Uma segunda metodologia de desidratação foi proposta, na qual se eliminou o algodão úmido do processo; a gota contendo os tardígrados foi colocada diretamente no fundo do recipiente plástico. O recipiente foi coberto com filme plástico, porém, dessa vez furos não foram feitos no filme, a fim de garantir uma maior umidade relativa dentro do recipiente por mais tempo (Fotografia 3). Similarmente à primeira metodologia, foram preparados 10 recipientes, cada um contendo oito animais e 10 repetições. Os recipientes foram deixados sobre bancada no laboratório, em condições ambientes da sala, permanecendo intocados

por sete dias. Os animais foram reanimados seguindo o mesmo procedimento relatado na metodologia descrita anteriormente.

Fotografia 3 – Detalhes da segunda metodologia de desidratação. Suporte de isopor com os 10 recipientes contendo os animais do teste (A) e imagem da gota no recipiente (B)



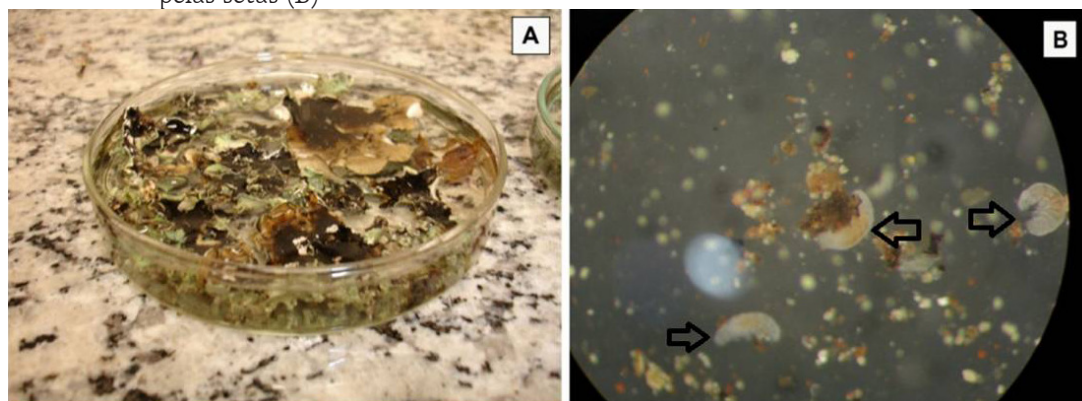
Fonte: os autores.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRAÇÃO DOS ANIMAIS DA NATUREZA

A metodologia utilizada (Fotografia 4) se mostrou simples e eficiente para a extração dos animais. Na água decantada das amostras de musgos e líquens foram observados pedaços de folhas, terra e diversos outros animais, como anelídeos e rotíferos. Depois de localizados, os tardígrados puderam ser facilmente extraídos com o uso de micropipetas e transferidos para outros recipientes.

Fotografia 4 – Placa de Petri montada com amostras de líquens (A) e visualização do sedimentado sob o estereomicroscópio, em fundo preto. Na imagem, três tardígrados indicados pelas setas (B)



Fonte: os autores.

Na literatura são encontrados outros métodos para a separação de tardígrados de amostra, um pouco mais complexos, que buscam uma maior pureza da água que sedimenta. Normalmente fazem uso de peneiras e/ou telas (1 mm de malha) para retirar o excesso de sedimentos. Nelson (2002) sugere a extração de forma simplificada, apenas colocando os líquens/musgos em água destilada por um período, em seguida agitando-os sobre a água (para soltar os animais agarrados) e após retirar a amostra, passando esta água por uma peneira. Ludström e Svensson (2006) e Vargha et al. (2002) fizeram uso de metodologias mais complexas, usando além de peneiras, funis, tubos e até centrifugação.

3.2 SELEÇÃO DE ESPÉCIES COM POTENCIAL PARA O CULTIVO COM *CHLORELLA VULGARIS*

Das cinco espécies testadas, apenas uma apresentou coloração estomacal esverdeada depois de transcorrido os sete dias (Fotografia 5). Os animais da espécie que consumiram *Chlorella vulgaris* foram, então, submetidos a análises taxonômicas e também aos testes para estabelecimento da cultura em laboratório.

Fotografia 5 – Tardígrado com coloração estomacal esverdeada, em razão do conteúdo de clorofila



Fonte: os autores.

3.3 TAXONOMIA E IDENTIFICAÇÃO

A imobilização de animais utilizando-se água rica em CO₂, metodologia adaptada do trabalho de Hokirawa et al (2008), permitiu a visualização do animal de forma mais estática durante um breve período, facilitando que este fosse fotografado. Todavia, foi necessário repetir essa prática diversas vezes para obter uma visualização satisfatória e boas fotos. Apesar de se tratar de uma metodologia alternativa em comparação com métodos

de imobilização mais complexos, como álcool polivinil, usado no trabalho de Bartels et al. (2011), é mais trabalhosa e cansativa.

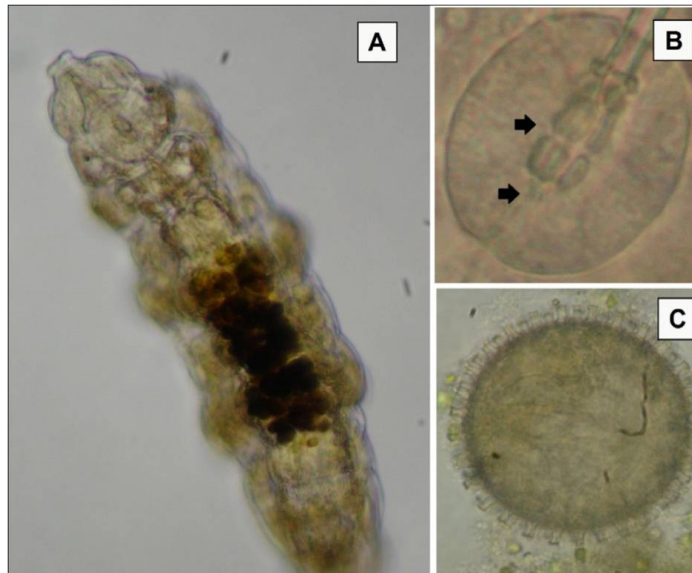
O animal que apresentou afinidade por *Chlorella vulgaris* foi identificado como eutardígrado, pois não apresentava armadura protetora, possuía garras duplas do tipo hufelandi, aparelho bucal com duas macroplacas (sendo a primeira maior e com uma ligeira constrição) e uma microplaca, coloração transparente quando jovem e cinza/marrom quando mais velho. Os ovos, brancos, eram depositados livremente, algumas vezes em grupos, e apresentava ornamentações similares a pequenas taças, características que permitiram identificar o animal como *Macrobiotus hufelandi* (Fotografia 6).

Uma segunda espécie foi submetida à identificação, pois apresentava características contrastantes dos demais tardígrados encontrados no *Campus*, facilitando sua identificação. O animal apresentava aparelho bucal bem distinto de qualquer outra espécie, com um largo tubo e seis pequenas papilas em sua ponta, papilas cefálicas, uma de cada lado da cabeça. Apresentava também grande porte, muito agitado, garras duplas simétricas, com duas garras adicionais longas e finas sobre as garras duplas. Tais características permitiram identificar o animal como *Milnesium tardigradum* (Fotografia 7).

Tanto *Milnesium tardigradum* quanto *Macrobiotus hufelandi* são espécies consideradas endêmicas, facilmente encontradas e com ocorrência em diversas localidades do mundo. Assunção (1999) relata a ocorrência das duas espécies no estado de São Paulo.

Os trabalhos de taxonomia realizados neste estudo se limitaram ao uso de microscopia ótica, mas outras metodologias utilizam microscopia eletrônica de varredura e microscopia de contraste de fase e contraste de interferência diferencial (DIC), instrumentos que podem ser utilizados na identificação de espécies que não são tão facilmente identificáveis como as duas apresentadas no trabalho. São utilizadas também para a classificação de novas espécies, permitindo a maior captação de detalhes, como observado em diversos trabalhos taxonômicos (DEGMA; MICHALCZYK; KCZMAREK, 2008; KACZMAREK; MICHALCZYK; GUIDETTI, 2006; KACZMAREK et al., 2011; MICHALCZYK; KACZMAREK, 2007; BEASLEY; KCZMAREK; MICHALCZYK, 2006).

Fotografia 6 – *Macrobiotus hufelandi* (A). Detalhe do aparelho bucal, com duas macroplacas e uma microplaca, apontadas pelas setas (B). Ovo do animal obtido da cultura, com ornamentações (C)



Fonte: os autores.

Fotografia 7 – *Milnesium tardigradum* (A). Imagem das duas últimas pernas do animal. Apontadas pelas flechas estão as garras duplas em cada perna com uma longa e fina garra anexa (B). Aparelho bucal com tubo longo, com papilas na região terminal da boca e papilas cefálicas, ambas apontadas pelas flechas (C)



Fonte: os autores.

3.4 ESTABELECIMENTO DA CULTURA DE TARDÍGRADOS

Os primeiros resultados do cultivo de tardígrados em laboratório demonstraram que, após cerca de duas semanas, o excesso de alga adicionado aos recipientes de cultivo dificultou a manipulação dos animais e a coleta dos ovos, pois estes se encontravam na maioria das vezes no interior dos aglomerados de *Chlorella vulgaris*. Além disso, em decorrência da falta de troca do alimento antigo, observou-se que as algas adicionadas inicialmente começaram a apresentar coloração pálida, com excesso de fungos e bactérias, fazendo com que os animais entrassem frequentemente em anoxibiose (criptobiose em razão da falta de oxigênio dissolvido). Observou-se também que o ágar utilizado como substrato para locomoção se rompia facilmente durante a manipulação dos animais, além do fato de alguns animais ficarem presos entre o ágar e as paredes do recipiente plástico. Problemas com o uso de ágar como substrato de locomoção também foram relatados por Suzuki (2003).

Decidiu-se, portanto, neste trabalho, eliminar o ágar dos recipientes, já que os animais se locomoviam relativamente bem no fundo plástico. As trocas de água foram intensificadas, sendo realizadas a cada dois dias, a fim de remover o excesso de contaminantes e aerar melhor a cultura. Juntamente com a água, grande parte da *C. vulgaris* era trocada, evitando o desenvolvimento de fungos e bactérias.

Em decorrência da frequente troca de alimento, menores quantidades de microalgas eram adicionadas por vez na cultura. Decidiu-se utilizar uma metodologia similar à proposta por Hokirawa et al, (2008). A cada troca eram adicionados 60 ul de uma suspensão de *C. vulgaris*, com concentração de cerca de 5×10^6 células/ml. Tal quantidade constituiu-se alimento o suficiente para breves períodos de alimentação dos animais e não forma grandes aglomerados, permitindo fácil captura dos animais, coleta dos ovos, troca do alimento velho e também evitou que um excesso de matéria orgânica morta propiciasse o desenvolvimento exagerado de bactérias e fungos. Ainda assim é recomendada a transferência de todos os animais e ovos para novos recipientes limpos e higienizados a cada uma ou duas semanas, para que os animais se mantenham frequentemente ativos e em crescimento.

Tal procedimento tem apresentando bons resultados, não sendo mais observada a entrada dos animais em anoxibiose. O acompanhamento da cultura permitiu observar que após 12 dias das posturas dos ovos, os primeiros filhotes haviam nascido. Os primeiros adultos mortos foram vistos após 92 dias do início da cultura.

3.5 METODOLOGIAS ALTERNATIVAS DE DESIDRATAÇÃO

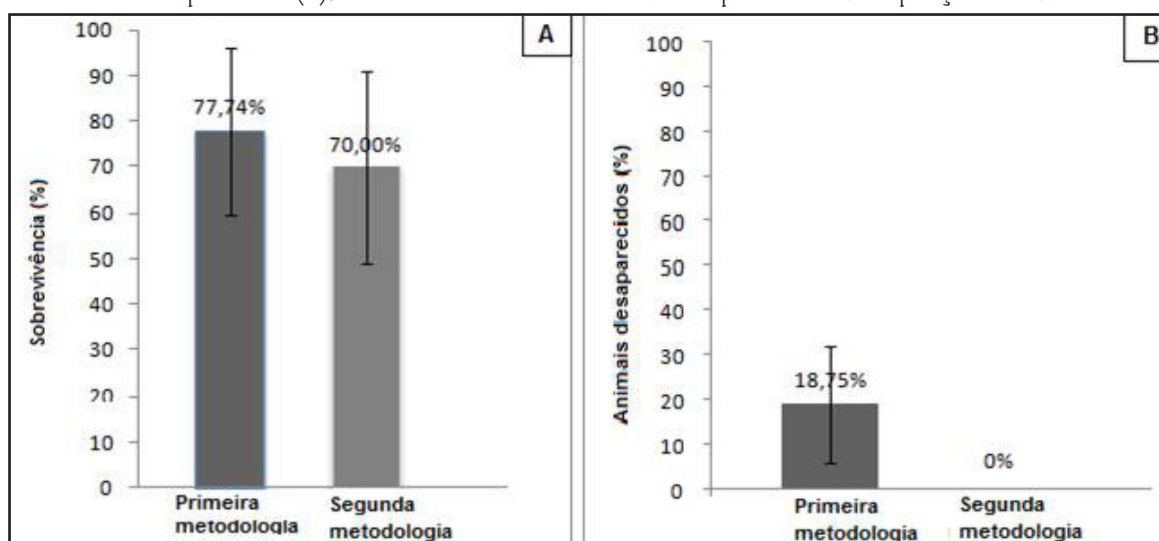
Na literatura são relatadas diversas metodologias de desidratação, além dos parâmetros de sobrevivência adotados. Ludström e Svensson (2006) testaram duas espécies, deixando os animais por 48 horas em dessecadores, observando-os por três horas e considerando como vivos aqueles com qualquer sinal de movimento, obtendo sobrevivência máxima de cerca de 65 e 78% para as diferentes espécies. Hokirawa et al. (2008) deixaram os animais por 48 horas em umidade relativa de 85%, depois

em umidade relativa 0% por 10 dias, observando-os por 24 horas após a hidratação e considerando vivos apenas aqueles com capacidades de locomoção. Nesse caso, fez-se uso de animais pré-cultivados, e obteve-se índices de sobrevivência acima dos 90%. Jönsson et al. (2008) mantiveram duas espécies de animais por 12 dias, em dessecador com umidade relativa de 65%, considerando como vivos aqueles com qualquer sinal de movimento, e obtiveram índices de sobrevivência de 40 e 66%. Já Bertolani et al. (2004) consideraram como sobreviventes apenas animais com movimentos coordenados do corpo.

No presente trabalho, como já mencionado, os animais foram observados por três horas e considerados como sobreviventes aqueles que apresentavam movimentos coordenados do corpo. Os resultados da primeira e da segunda metodologia de desidratação foram dispostos em forma de gráfico (Gráfico 1).

Na primeira apesar de uma sobrevivência relativamente elevada (77,73%), alguns animais se locomoveram para fora do suporte plástico, caindo no algodão úmido, gerando uma perda de 18,75% de animais, em média, por experimento. Quanto à segunda metodologia de desidratação testada, o problema com animais perdidos foi resolvido, porém, a taxa de sobrevivência, de 70% não foi tão elevada como a metodologia anterior. Todavia, trata-se de uma metodologia relativamente simples e rápida de executar. Além disso, o índice de sobrevivência de 70% é similar aos encontrados por Ludström e Svensson (2006) e Jönsson et al. (2008), estando portanto dentro de limites aceitáveis.

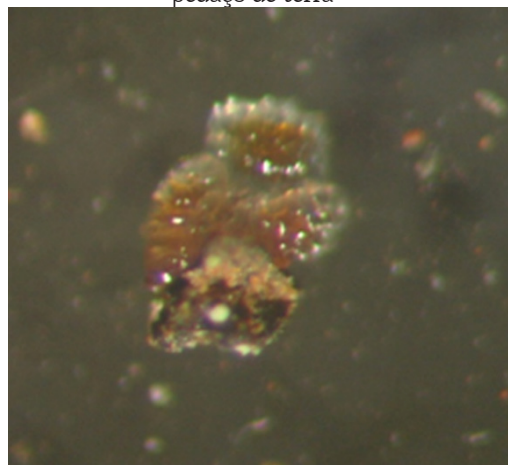
Gráfico 1 – Sobrevivência dos animais após a primeira e a segunda metodologia de desidratação (A) e animais desaparecidos (B). As barras de erro indicam o desvio padrão nas 10 repetições realizadas



Fonte: os autores.

Vale ressaltar que nas duas metodologias, pequenos detritos (pedaços de terra e de líquen) provenientes da coleta dos animais da natureza acabaram juntos com os animais nos recipientes plásticos do experimento. Boa parte dos animais se agrupava ao redor destes detritos (Fotografia 8), pois provavelmente estes ajudavam um pouco na manutenção da umidade por um período mais longo, aumentando a chance de sobrevivência dos tardígrados. Tal fenômeno também foi relatado por Crowe (1972).

Fotografia 8 – Três tardígrados em anidrobiose, em razão da desidratação, agrupados próximos a um pedaço de terra



Fonte: os autores.

4 CONCLUSÃO

Conseguiu-se estabelecer com sucesso um cultivo do tardígrado *Macrobiotus hufelandi*, utilizando-se *Chlorella vulgaris* como alimento, adicionando-se quantidades controladas de alga e água, e realizando a troca da água e alimento a cada dois dias. Quando necessário os animais e os ovos devem ser transferidos para novos recipientes mais higienizados. As metodologias de desidratação apresentadas demonstraram bons resultados, similares aos encontrados pela literatura, podendo constituir-se de alternativas mais simples para estudos de anidrobiose com os animais, nos casos de não se dispor de um dessecador químico. Espera-se de uma forma geral que este trabalho auxilie futuros trabalhos com tardígrados no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ALTIERO, T.; REBECHI, L. Rearing Tardigrades: Results and Problems. **Zoologischer Anzeiger**, v. 240, n. 3, p. 217-221, 2001.
- ASSUNÇÃO, C. M. L. Tardígrados. In: ISMAEL, D. et al. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Invertebrados marinhos**. São Paulo: FAPESP, 1999, cap. 27, p. 60-64.
- BARTELS, P. J. et al. *Ramazzottius belubellus*, a new species of Tardigrada (Eutardigrada: Parachela: Hypsibiidae) from the Great Smoky Mountains National Park. **Proceedings of the biological society of Washington**, v. 124, n. 1, p. 23-27, 2011.

BEASLEY, C. W.; KACZMAREK, L.; MICHALCZYK, L. Redescription of *Doryphoribius Vietnamensis* (Iharos, 1969) (Tardigrada) com. Nov. on the basis of the holotype and additional material from China. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 52, n. 4, p. 367–372, 2006.

BERTOLANI, R. et al. L. Experiences with dormancy in tardigrades. **Journal of Limnology**, v. 63, n. 1, p. 16-25, 2004.

BERTOLANI, R. Evolution of the Reproductive Mechanisms in Tardigrades – A Review. **Zoologischer Anzeiger – A journal of Comparative Zoology**, v. 240, n. 3, p. 247-252, 2001.

BERTOLANI, R.; REBECCHI, L.; BECCACCIOLI, G. Dispersal of *Ramazzottius* and other tardigrades in relation to type of reproduction. *Invertebrate reproduction and development*, v. 18, n. 3, p. 153-157, 1990.

CROWE, J. H. Evaporative water loss by tardigrades under controlled relative humidities. **Biol. Bull.**, v. 142, n. 3, p. 407-416, 1972.

DEGMA, P.; BERTOLANI, R.; GUIDETTI, R. **Actual checklist of Tardigrada species**. Disponível em: <<http://www.tardigrada.modena.unimo.it>>. Acesso em: 26 ago. 2011.

DEGMA, P.; MICHALCZYK, L.; KACZMAREK, L. *Macrobotus derkai*, a new species of Tardigrada (Eutardigrada, Macrobiotidae, huziori group) from the Colombian Andes (South America). **Zootaxa**, v. 1731, p. 1-23, 2008.

DEGMA, P.; GUIDETTI, R. Notes to the current checklist of Tardigrada. **Zootaxa**, v. 1579, p. 41–53, 2007.

FUNCRYPOTA – “**Funktionelle analyse dynamischer Prozesse in Cryptobiotischen Tardigraden**” Disponível em: <<http://www.funcrypta.de/www/en/>>. Acesso em: 18 jul. 2011.

GABRIEL, W. N. et al. The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying the evolution of development. **Developmental Biology**, v. 312, n. 2, p. 545–559, 2007.

GLIME, J. M. Tardigrades reproduction and food. In: _____. **Bryophyte Ecology, Bryological Interaction**. Michigan: Michigan Technological University and the International Association of Bryologists, 2010, cap. 5. 2, v. 2. Disponível em: <<http://www.bryoecol.mtu.edu/>>. Acesso em: 21 jun. 2011.

GREVEN, H. Comments on the eyes of tardigrades. **Arthropod Structure & Development**, v. 36, n. 4, p. 401-407, 2007.

GUIDETTI, R.; BERTOLANI, R. Tardigrade taxonomy: an updated check list of the taxa and a list of characters for their identification. **Zootaxa**, v. 845, p. 1-46, 2005.

HALBERG, K. A. et al. Ciclomorphosis in Tardigrada: adaptation to environmental constraints. *The Journal of Experimental Biology*, v. 212, n. 17, p. 2803-2811, 2009.

HENGHER, S. Freeze tolerance, supercooling points and ice formation: comparative studies on subzero temperature survival on limno-terrestrial tardigrades. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 6, p. 802-807, 2009a.

_____. High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 82, n. 6, p. 749-755, 2009b.

HOKIRAWA, D. D. et. al. Establishment of a Rearing System of the Extremotolerant Tardigrade *Ramazzottius varieornatus*: A New Model Animal for Astrobiology. **Astrobiology**, n. 3, v. 8, p. 549-556, 2008.

HOKIRAWA, D. D. et. al. Radiation tolerance in the tardigrade **Milnesium tardigradum**. **International journal of radiation biology**, v. 82, n. 12, p. 843-848, 2006.

HOKIRAWA, D.D. The Tardigrades *Ramazzottius varieornatus* as a Model Animal for Astrobiological Studies. **Biological Sciences in Space**, v. 22, n. 3, p. 93-98, 2008.

JACOBSEN, J. E. On the nature of pharyngeal muscle cells in the Tardigrada. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 116, n. 1, p. 123-138, 1996.

JÖNSSON, K. I.; BORSARI, S.; REBECCHI, L. Anhydrobiotic Survival in Population of the Tardigrade *Ramazzotti oberhaueseri* from Italy and Sweden. **Zoologischer Anzeiger**, v. 240, n. 3, p. 419-423, 2001.

JÖNSSON, K. L. et. al. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. **Curent Biology**, v. 18, n. 17, p. 729-731, 2008.

JÖNSSON, K. I.; SCHILL, R. O. Induction of Hsp70 by dessication, ionizing radiation and heat-shock in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, n. 4, p. 456-460, 2007.

KACZMAREK, L. et. al. Ecological factors determining Tardigrada distribution in Costa Rica. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 49, n. 1, p. 78-83, 2011.

KACZMAREK, L.; MICHALCZYK, L.; GUIDETTI, R. Description of the new species *Calcarobiotus (C.) longinoi* sp. nov. (Eutardigrada, Macrobiotidae) from Costa Rica with the diagnostic key to the genus *Calcarobiotus*. **Italian Journal of Zoology**, v. 73, n. 3, p. 247-253, 2006.

LUNDSTRÖM, J.; SVENSSON, L. The effect of dehydration rates on anhydrobiotic survival and trealose levels in tardigrades. **Tsunami**, v. 3, n. 1, p. 1-32, 2006.

MICHALCZYK, L.; KACZMAREK, L. *Echiniscus ganczareki*, a new species of Tardigrada (Heterotardigrada: Echiniscidae, bigranulatus group) from Costa Rica. **Zootaxa**, v. 1471, p. 15-25, 2007.

MJOLBERG, N. et. al. Survival in extreme environments – on the current knowledge of adaptations in tardigrades. **Acta Physiologica**, v. 202, n. 3, p. 409-420, 2011.

NEILSON, D. R. Current Status of the Tardigrada: Evolution and Ecology. **Integ. And comp. Biology**, v. 42, n. 3, p. 652-659, 2002.

ONO, F. et. al. Effect of high hydrostatic pressure on to life of the tiny animal tardigrade. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 69, n. 9, p. 297-300, 2008.

OTESSEN, P. S.; MEIER, T. Tardigrada from the Husvik area, South Georgia, sub-Antartic. **Polar Research**, v. 8, n. 2, p. 291-294, 1990.

PILATO, G.; BINDA, M.G. Definition of families, subfamilies, genera and subgenera of the Eutardigrada, and keys to their identification. **Zootaxa**, v. 2404, p. 1-54, 2010.

RAMAZZOTTI, G.; MAUCCI, W. **The phylum tardigrada**. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia Dott. Marco de Marchi. English Version. Tradução Clark W. Beasley, 3. ed., 1983, 1012 p.

RAMLOV, H.; WESTH, P. Cryptobiosis in the Eutardigrade *Adorybiotus (Richtersius) coronifer*: Tolerance to Alcohols, Temperature and *de novo* Protein Synthesis. **Zoologischer Anzeiger – A Journal of Comparative Zoology**, v. 240, n. 3, p. 517-523, 2001.

_____. Survival of the cryptobiotic eutardigrade *Adorybiotus coronifer* during cooling to -196 °C: Effect of cooling rate, trehalose level, and short-term acclimation. **Criobiology**, v. 29, n. 1, p. 125-130, 1992.

RIPKA, R. et. al. Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

SCHILL R.O. et. al. Food of tardigrades: a case study to understand food choice, intake and digestion. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. v. 49, n. 1, p. 66-70, 2011.

SCHILL, R. O. et. al. Molecular mechanisms of tolerance in tardigrades: New perspectives for preservation and stabilization of biological material. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 348-352, 2009.

SCHIMIDT-RHAESA, A.; KULESSA, J. Muscular architecture of *Milnesium tardigradum* and *Hyphsibius* sp. (Eutardigrada, Tardigrada) with some data on *Ramazottius oberhaeuseri*. **Zoomorphology**, v. 126, n. 4, p. 265-281, 2007.

SUZUKI, A.C. Life history of *Milnesium tardigradum* Doyère (tardigrada) under a rearing environment. **Zoological science**, v. 20, n. 1, p. 49-57, 2003.

WRIGHT, J. C. Cryptobiosis 300 Years on from van Leuwenhoek: What Have We Learned about Tardigrades? **Zoologischer Anzeiger**, v. 240, n. 3, p. 563-582, 2001.

Recebido em 28 de novembro de 2011

Aceito em 26 de fevereiro de 2012

